

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY 128 164

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 80 07 02 /P. 225453/

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 82 01 04

Opis patentowy opublikowano: 1985 06 28

CZYTELNIA

Urzedu Patentowego

Int. Cl.³ C12P 19/00
A61K 31/71

Twórcy wynalazku: Wojciech Gruszecki, Maria Gdulawicz-Gruszecka, Edward Borowski,
Ewa Ortel

Uprawniony z patentu: Politechnika Gdańska, Gdańsk /Polska/

SPOSÓB WYTWARZANIA PREPARATU AUREOFACYN

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania preparatu aureofacyny. Aureofacyna znana także pod nazwą ayfaktyny /AYF/ oraz patracyny jest antybiotykiem z grupy makrolidów polienowych. Na skutek swojej dużej aktywności przeciwgrzybowej i korzystnych właściwości terapeutycznych stwarza dużą możliwość jej wprowadzenia do lecznictwa. Antybiotyk aureofacyna wyodrębniana dotychczas z brzezki fermentacyjnej szczepu *Streptomyces aureofaciens* jest w postaci kompleksu antybiotyków.

Surowy preparat aureofacyny otrzymuje się według znanej metody na drodze fermentacji szczepu *Streptomyces aureofaciens* w hodowli głębinowej przewietrzanej na pożywce i w warunkach powszechnie stosowanych fermentacji promieniowców, po czym brzezkę fermentacyjną poddaje się ekstrakcji n-butanolem, zaś oddzielony ekstrakt butanolowy zagęszcza się w próżni do małej objętości i surową aureofacynę wytrąca się nadmiarem acetonu, oddziela wytrącony osad, przemywa kilkakrotnie suchym acetonem, pozostałość suszy w próżni w pokojowej temperaturze.

Wyodrębniona w ten sposób aureofacyna wykazuje $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 500 - 600$ przy długości fali $\lambda \approx 380 \text{ nm}$. Tak wyodrębniona aureofacyna jest toksyczna oraz nierozpuszczalna w wodzie i płynach fizjologicznych. Niedogodności te w istotny sposób ograniczają stosowanie aureofacyny w lecznictwie i dlatego nie jest ona dotychczas lekiem. Dotychczas nie stosowano oczyszczania preparatu uzyskanego z brzezki fermentacyjnej.

Celem wynalazku jest otrzymanie aureofacyny pozbawionej wyżej wymienionych niedogodności. Według wynalazku sposób wytwarzania preparatu aureofacyny, z surowego preparatu uzyskanego z brzezki fermentacyjnej otrzymanej na drodze fermentacji szczepu *Streptomyces aureofaciens* w hodowli głębinowej przewietrzanej, na pożywce i w warunkach stosowanych fermentacji promieniowców, z zastosowaniem butanolu jako rozpuszczalnika aureofacyny, charakteryzuje się tym, że surową aureofacynę traktuje się butanolem z toluenem w proporcji 1 : 1, w temperaturze 20 - 50°C, po czym po oddzieleniu ekstraktu pozostałość zawierającą antybiotyk przemywa się toluenem i heksanem i ekstrahuje się aureofacynę metanolem z dodatkiem kwaśnego węgla potasu lub sodu użytego w ilości po-

trzebnej do stanu nasycenia roztworu, do ekstraktu dodaje butanolu w ilości około jednej czwartej części objętościowej metanolu, po czym wytrąca się czysty antybiotyk aureofacynę przez odparowanie polarnych rozpuszczalników, zaś wytrącony osad aureofacyny przemywa się toluenem i heksanem i ponownie rozpuszcza się w metanolu z dodatkiem kwaśnego węglanu potasu lub sodu użytego w ilości potrzebnej do uzyskania stanu nasycenia, do roztworu dodaje butanolu w ilości około jednej czwartej części objętościowej metanolu, po czym wytrąca się antybiotyk aureofacynę przez odparowanie rozpuszczalników.

Korzystnym jest, iż po pierwszej ekstrakcji metanolem z dodatkiem kwaśnego węglanu potasu albo sodu, pozostałość ekstrahuje się kilkakrotnie mieszaniną rozpuszczalników butanol : metanol : woda o składzie objętościowym 10 : 2 : 3, a przesącz po tej ekstrakcji łączy się z pierwszym przesączem metanolowym, po czym wytrąca czysty antybiotyk przez odparowanie rozpuszczalników, przy czym butanol wprowadza się wówczas do układu, przed odparowaniem rozpuszczalników, w mieszaninie rozpuszczalników butanol : metanol : woda.

Alternatywny sposób wytwarzania preparatu aureofacyny z surowego preparatu uzyskanego z brzojki fermentacyjnej otrzymanej na drodze fermentacji szczepu *Streptomyces aureofaciens* w hodowli głębinowej przewietrzanej, na pożywce i w warunkach stosowanych fermentacji promieniowców, z zastosowaniem butanolu jako rozpuszczalnika aureofacyny i acetonu jako substancji wytrącającej aureofacynę z roztworu, charakteryzuje się tym, że surową aureofacynę traktuje się butanolem z toluenem w proporcji 1 : 1 w temperaturze 20 - 50°C, po czym po oddzieleniu ekstraktu pozostałość zawierającą aureofacynę przemywa się toluenem i heksanem i ekstrahuje się aureofacynę metanolem z dodatkiem kwaśnego węglanu potasu lub sodu użytego w ilości potrzebnej do stanu nasycenia roztworu, po czym wytrąca się czysty antybiotyk przez wprowadzenie do układu acetonu albo izopropanolu, a odsączoną aureofacynę ponownie rozpuszcza się w metanolu z dodatkiem kwaśnego węglanu potasu lub sodu w ilości potrzebnej do uzyskania stanu nasycenia i dodaje się butanolu w ilości około jednej czwartej części objętościowej metanolu, po czym wytrąca się aureofacynę przez odparowanie rozpuszczalników.

Według wynalazku uzyskuje się preparat aureofacyny w postaci nieznanego dotąd kompleksu z kwaśnym węglanem sodu lub potasu. Preparat aureofacyny o ekstynkcji $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2000$ przy długości fali $\lambda = 377\text{ nm}$ uzyskuje się w pierwszym etapie ekstrahowania metanolem z dodatkiem kwaśnego węglanu potasu lub sodu, po czym przez powtórne rozpuszczenie oczyszczonej aureofacyny w metanolu z kwaśnym węglanem potasu lub sodu przeprowadza się ją w formę rozpuszczalną w płynach fizjologicznych.

Wyzolowana aureofacyna sposobem według wynalazku wykazuje wysoką absorpcję w ultrafiolecie $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ około 2000 przy $\lambda = 377\text{ nm}$, co stanowi o jej wysokiej czystości i rzuca na aktywność biologiczną charakteryzującą się wartością stężenia antybiotyku hamującego rozwój drożdży *Sacharomyces cerevisiae*, $IC_{50} = 0,0005\text{ }\mu\text{g/ml}$ oraz miarą aktywności lizowania komórek na przykładzie krwinek ludzkich $SH_{50} = 4\text{ }\mu\text{g/ml}$. Otrzymana aureofacyna jest doskonale rozpuszczalna w wodzie i roztworach fizjologicznych, ponadto nadaje się również do stosowania na drodze iniekcji. Tak wyizolowana aureofacyna jest trwała.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady wykonania.

Przykład I. a/ Odtłuszczenie. 1 g surowej aureofacyny o ekstynkcji $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 450$ przy $\lambda = 377\text{ nm}$ rozciera się początkowo z 1 ml rozpuszczalnika składającego się w równych częściach objętościowych z butanolu i toluenu, a następnie miesza się z 75 ml tego rozpuszczalnika podczas podgrzewania na łaźni o temperaturze 50°C. Po czasie około pół godziny odsącza się rozpuszczalnik, a antybiotyk przemywa toluenem i heksanem. Do rozpuszczalnika przechodzą substancje tłuszczopodobne nieaktywne biologicznie w ilości około 20 % ciężaru początkowego antybiotyku.

b/ Usuwanie innych zanieczyszczeń zawartych w preparacie. Odtłuszczony antybiotyk rozciera się z 1 ml metanolu i 0,15 g kwaśnego węglanu potasu, miesza na łaźni o temperaturze 50°C z 75 ml metanolu przez pół godziny, a następnie sączy i ekstrahuje się antybiotyk trzykrotnie układem rozpuszczalników o składzie objętościowym butanol 10 : metanol 2 : woda 3 zbierając przesącze. Połączone przesącze ekstraktów wraz z ekstraktem metanolowym zagęszcza się próżniowo do 100 ml, a wytrącony antybiotyk odsącza się i przemyma toluenem i heksanem. Uzyskuje się około 700 g antybiotyku.

c/ Przeprowadzenie preparatu w formę rozpuszczalną w płynach fizjologicznych. Oczyszczony preparat dodatkowo ekstrahuje się 150 ml metanolu z 50 mg kwaśnego węglanu potasu w sposób podany wyżej. Osad nierozpuszczalny wraz z pozostałością po poprzedniej ekstrakcji zawiera jeszcze nikłe ilości antybiotyku i może być wykorzystywany ponownie. Przesączony ekstrakt metanolowy traktuje się 40 ml butanolu, zagęszcza próżniowo do objętości 30 ml. Wytrącony antybiotyk w ilości około 500 mg odsącza się i przemyma toluenem i heksanem. W tej formie rozpuszcza się doskonale w wodzie i płynach fizjologicznych, a jego absorpcja przy długości fali $\lambda = 377 \text{ nm}$ wynosi $E_1^1 = 1080$. Aktywność biologiczna tak oczyszczonej aureofacyny w stosunku do *Sacharomyces cerevisiae* $\text{IC}_{50} = 0,0005 \mu\text{g/ml}$, a właściwości lityczne oznaczone na krwinkach ludzkich $\text{EH}_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$.

P r z y k ł a d II. 5 g aureofacyny wstępnie odtłuszczonej, jak w przykładzie I rozciera się z małą ilością metanolu i 500 g węglanu sodu, miesza na łaźni o temperaturze 50°C z 400 ml metanolu przez pół godziny, a następnie sączy. Przesączony ekstrakt metanolowy traktuje się 100 ml butanolu, zagęszcza próżniowo do objętości 80 ml, a wytrącony antybiotyk przemyma się toluenem i heksanem i ponownie rozpuszcza w 900 ml metanolu z dodatkiem 300 mg kwaśnego węglanu sodu w sposób podany wyżej. Przesączony ekstrakt metanolowy traktuje 200 ml butanolu, zagęszcza próżniowo, po czym wytrącony antybiotyk przemyma toluenem i heksanem. Otrzymuje się 4,5 g czystej, rozpuszczalnej w wodzie aureofacyny o podobnych własnościach fizycznych i biologicznych do antybiotyku otrzymanego w przykładzie I.

P r z y k ł a d III . 5 g aureofacyny odtłuszczonej jak w przykładzie I ekstrahuje się 400 ml metanolu zawierającego 500 mg kwaśnego węglanu sodu. Przesączony ekstrakt zadaje się 1000 ml acetonu. Wytrącony osad czystej aureofacyny przemyma się toluenem i heksanem i ponownie rozpuszcza w 900 ml metanolu z dodatkiem 400 mg kwaśnego węglanu sodu. Przesączony ekstrakt metanolowy traktuje się 200 ml butanolu, zagęszcza próżniowo, a wytrącony antybiotyk przemyma toluenem i heksanem.

P r z y k ł a d IV. 20 g aureofacyny surowej o bardzo niskim stopniu czystości $/E_1^1 = 150/$ w wyniku oczyszczenia sposobem, jak w przykładzie I daje produkt o $E_1^1 = 1080$ w ilości 0,40 g.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania preparatu aureofacyny, z surowego preparatu uzyskanego z brzojki fermentacyjnej otrzymanej na drodze fermentacji szczepu *Streptomyces aureofaciens* w hodowli głębinowej przewietrzanej, na pożywce i w warunkach fermentacji promieniowców, z zastosowaniem butanolu jako rozpuszczalnika antybiotyku, z n a m i a n n y t y m, że surową aureofacynę traktuje się butanolem z toluenem w proporcji 1:1, w temperaturze $20 - 50^{\circ}\text{C}$, po czym po oddzieleniu ekstraktu, pozostałość zawierającą antybiotyk przemyma się toluenem i heksanem i ekstrahuje się aureofacynę metanolem z dodatkiem kwaśnego węglanu potasu lub sodu użytego w ilości potrzebnej do stanu nasycenia roztworu, do ekstraktu dodaje się butanolu w ilości około jednej czwartej części objętościowej metanolu, po czym wytrąca się czysty antybiotyk aureofacynę przez odparowanie polarnych rozpuszczalników, zaś wytrącony osad aureofacyny przemyma się toluenem i heksanem i ponownie rozpuszcza się w metanolu z dodatkiem kwaśnego węglanu potasu lub sodu użytego w ilości

potrzebnej do uzyskania stanu nasycenia, do roztworu dodaje się butanolu w ilości około jednej czwartej części objętościowej metanolu, po czym wytrąca się antybiotyk aureofacynę przez odparowanie rozpuszczalników.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że po pierwszej ekstrakcji metanolem z dodatkiem kwaśnego węgla potasu albo sodu, pozostałość ekstrahuje się kilkakrotnie mieszaniną rozpuszczalników butanol : metanol : woda o składzie objętościowym 10 : 2 : 3, a przesącz po tej ekstrakcji łączy się z pierwszym przesączem metanolem, po czym wytrąca się czysty antybiotyk przez odparowanie rozpuszczalników, przy czym butanol wprowadza się wówczas do układu, przed odparowaniem rozpuszczalników, w mieszaninie rozpuszczalników butanol : metanol : woda.

3. Sposób wytwarzania preparatu aureofacyny, z surowego preparatu uzyskanego z brzezki fermentacyjnej otrzymanej na drodze fermentacji szczepu *Streptomyces aureofaciens* w hodowli głębinowej przewietrzanej, na pożywce i w warunkach fermentacji promieniowców, z zastosowaniem butanolu jako rozpuszczalnika antybiotyku i acetonu jako substancji wytrącającej antybiotyk z roztworu, z n a m i e n n y t y m, że surową aureofacynę traktuje się butanolem z toluenem w proporcji 1 : 1, w temperaturze 20 - 50°C, po czym po oddzieleniu ekstraktu pozostałość zawierającą antybiotyk aureofacynę przemywa się toluenem i heksanem, ekstrahuje się aureofacynę metanolem z dodatkiem kwaśnego węgla potasu lub sodu użytego w ilości potrzebnej do stanu nasycenia roztworu, po czym wytrąca się czysty antybiotyk przez wprowadzenie do układu acetonu albo izopropanolu, a odsączoną aureofacynę ponownie rozpuszcza się w metanolu z dodatkiem kwaśnego węgla potasu lub sodu w ilości potrzebnej do uzyskania stanu nasycenia i dodaje się butanolu w ilości około jednej czwartej części objętościowej metanolu, po czym wytrąca się antybiotyk aureofacynę przez odparowanie rozpuszczalników.